

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07209292 A**

(43) Date of publication of application: **11.08.95**

(51) Int. Cl

G01N 33/50

(21) Application number: **06014025**

(22) Date of filing: **12.01.94**

(71) Applicant: **POLA CHEM IND INC**

(72) Inventor: **KAWASHIMA TADAOKI
ARAKI HIROMITSU
OHATA SATOSHI**

(54) **METHOD FOR MEASURING EXTENT OF
DAMAGE ON CUTICLE CELL OF SKIN**

(57) Abstract:

PURPOSE: To realize a noninvasive measurement of the extent of damage on the skin by sticking a cuticle cell of skin to a tape coated with a viscous substance, stripping the tape using a solvent and bonding the cuticle cell to a color plate and then observing the cuticle cell through a microscope.

CONSTITUTION: A tape is coated with a viscous substance soluble to organic solvent, e.g. polyvinylacetate, polyvinylalcohol or polyvinylacetal.

The tape is applied, on the viscous side thereof, to a skin and then it is peeled off thus sampling a cuticle cell. The tape is then applied, on the viscous side thereof, to a color plate coated with a polyvinyl-based, melamine resin-based or phenol resin-based bond. Subsequently, the viscous substance is dissolved using an organic solvent, e.g. methanol or ethanol, and the tape is peeled off. The cuticle cell is fixed to the color plate and dyed thus preparing a sample which is observed through a microscope thus measuring the extent of damage on the skin noninvasively.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-209292

(43)公開日 平成7年(1995)8月11日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/50

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Q

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平6-14025

(22)出願日 平成6年(1994)1月12日

(71)出願人 000113470

ポーラ化成工業株式会社

静岡県静岡市弥生町6番48号

(72)発明者 川島 忠興

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560ポーラ化

成工業株式会社戸塚研究所内

(72)発明者 荒木 啓光

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560ポーラ化

成工業株式会社戸塚研究所内

(72)発明者 大畑 智

神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1ポ

ーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

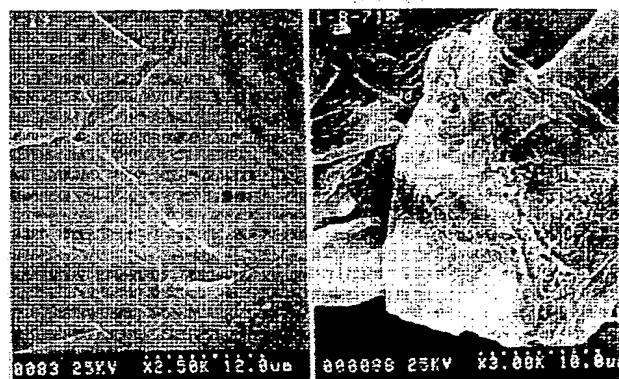
(54)【発明の名称】 皮膚角質細胞のダメージ度の測定法

(57)【要約】

【目的】 アトピー性皮膚炎患者の皮膚の状態を、治療効果を判定しながら診断することを可能とするために、皮膚のダメージ度を簡単に非侵襲的に測定する方法を提供する。

【構成】 有機溶剤に可溶性粘着物質を塗布したテープに皮膚角質細胞を貼着し、このテープをあらかじめ固着剤を塗布した着色板にテープの粘着面が接するようにして貼付け、前記有機溶剤で粘着物質を溶解させることによりテープを着色板から剥離させて角質細胞を着色板に固定し、得られた角質細胞標本を用いて角質細胞の形態学的特徴を顕微鏡観察する。

図面代用写真



写 真

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有機溶剤に可溶性粘着物質を塗布したテープに皮膚角質細胞を貼着し、このテープをあらかじめ固着剤を塗布した着色板にテープの粘着面が接するようにして貼付け、前記有機溶剤で粘着物質を溶解させることによりテープを着色板から剥離させて角質細胞を着色板に固定し、得られた角質細胞標本を用いて角質細胞の形態学的特徴を顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質細胞のダメージ度の測定法。

【請求項2】 請求項1において、角質細胞標本を標本の表側から顕微鏡観察し、さらに、皮膚角質細胞を貼着したテープを裏面から顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質細胞のダメージ度の測定法。

【請求項3】 請求項1または2において、さらに、有機溶剤に可溶性粘着物質を塗布したテープに皮膚角質細胞を貼着し、このテープをあらかじめ固着剤を塗布した透明板にテープの粘着面が接するようにして貼付け、前記有機溶剤で粘着物質を溶解させることによりテープを透明板から剥離させて角質細胞を透明板に固定し、これをH E染色、P A S染色、D A C M染色から選ばれる方法により染色して得られる皮膚角質細胞染色標本を顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質細胞のダメージ度の測定法。

【請求項4】 前記有機溶剤に可溶性粘着物質を塗布したテープが、窓孔を有するホルダーに、この窓孔に対応するように貼着されたものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の皮膚角質細胞のダメージ度の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、皮膚角質細胞のダメージ度の測定法に関し、詳しくは、アトピー性皮膚炎患者の診断を確実にするために、皮膚の表面角質細胞のダメージ度を測定する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アトピー性皮膚炎は、かゆみ、皮膚の炎症、皮膚の乾燥感などを主症状とする皮膚病であり、主に乳幼児期から発症し小児期までに治癒することが多いが、近年成人になっても治らず慢性化している例が増えている皮膚疾患である。根本的な治療法は確立されておらず、ほとんど対症療法に頼っているのが現状である。本疾患の発症には、食事（米、牛乳、卵等）や環境因子（ハウスダスト、ダニ、カビ等）によるアレルギー性の要因や生活環境の変化（乾燥状態等）や、掻破等による皮膚のバリアー機能の低下の要因が深く関与しているとされている。

【0003】上記のアレルギー性の要因を検査する方法として、アレルギー性については、血清中のI g E抗体値を測定する方法やアレルギーを直接皮膚に滴下、皮下注射及び貼付等の方法により接触させ、その後の皮膚反

応を測定する方法などが行われている。

【0004】しかし、これらの方法により選択されたアレルギーが、アトピー性皮膚炎の発症と直接結びつくかどうかははっきりしない。選択された可能性の高い卵、牛乳等の食物アレルギーを発見しても、治療上それらを除去した食事を維持するのに栄養上の問題などを含み容易でないのが現状である。また、血液中のI g E抗体は、あくまで患者のアレルギーの強さのおおまかな目安と考えられ、I g E抗体価が高くてもアトピー性皮膚炎が全く治っている場合や抗体価が全く検出されないのに皮膚の炎症が続いている場合がある。したがって、治療上、抗体価に固執しすぎると栄養上などの問題を引き起こす可能性がある。

【0005】一方、皮膚のバリアー機能の低下（ダメージ度）については、（a）皮脂量の測定、（b）経表皮水分損失量（TWL）の測定、（c）角層水分量の測定などが知られているが、いずれも専用の機器を用い、測定条件をかなり厳密に設定した上で時間をかけた測定が必要であることなどから、一般的診療において利用するのが困難である。また、（d）皮膚を直接切除して病理組織学的検査を行う方法もあるが、痛みを伴う点や皮膚の角層の状態を評価できないこと等により、現在まで皮膚の検査による診断はほとんど行われていない。

【0006】ところで、皮膚角層を検査する方法として、有機溶剤に可溶性粘着物質を塗布してあるとともに、この粘着性物質に皮膚角質層を付着せしめたテープを、あらかじめ固着剤を塗布せしめた透明板に張り付け、次に、これを有機溶剤に浸漬した後、該テープを取り去ることにより実質的に角質層の一部を透明板上に固定し、必要によりこれを染色して作成された角質層標本により角質層の状態を検査する方法が本出願人により開示されている（特開昭63-113358号公報）。この方法によると、肌の状態、肌性、肌質、肌の老化度合等を検査することはできるが、皮膚のバリアー機能の低下（ダメージ度）を判定することは困難である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記観点からなされたものであり、アトピー性皮膚炎患者の皮膚の状態を、治療効果を判定しながら診断することを可能とするために、皮膚のダメージ度を簡単に非侵襲的に測定する方法を提供することを課題とする。

【0008】

【問題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、皮膚のダメージ度を簡単に非侵襲的に測定するには、皮膚の最外層の角質細胞を病理組織学的あるいは形態学的に観察することが最良であると考えた。そして、皮膚の角質細胞を剥離し透明板あるいは着色した樹脂板に保持せしめ、この角質細胞に適当な染色や蛍光染色を行い、光学顕微鏡あるいは走査型電子顕微鏡観察し、角質細胞の不全角化、細

胞剥離の異常、細胞表面の多糖類の存在、角化過程における角層の形成異常、角質細胞の体表面側および裏面の形態学的な異常等について病理組織学的あるいは形態学的に評価することにより、皮膚のダメージ度を測定することができることを見出し、本発明に至った。

【0009】すなわち本発明は、有機溶剤に可溶な粘着物質を塗布したテープに皮膚角質細胞を貼着し、このテープをあらかじめ固着剤を塗布した着色板にテープの粘着面が接するようにして貼付け、前記有機溶剤で粘着物質を溶解させることによりテープを着色板から剥離させて角質細胞を着色板に固定し、得られた角質細胞標本を用いて角質細胞の形態学的特徴を顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質細胞のダメージ度の測定法である。

【0010】また、本発明の一態様として、上記測定法において、角質細胞標本を標本の表側から顕微鏡観察し、さらに、皮膚角質細胞を貼着したテープを裏面から顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質細胞のダメージ度の測定法、さらに、有機溶剤に可溶な粘着物質を塗布したテープに皮膚角質細胞を貼着し、このテープをあらかじめ固着剤を塗布した透明板にテープの粘着面が接するようにして貼付け、前記有機溶剤で粘着物質を溶解させることによりテープを透明板から剥離させて角質細胞を透明板に固定し、これをH E染色、P A S染色、D A C M染色から選ばれる方法により染色して得られる皮膚角質細胞染色標本を顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質細胞のダメージ度の測定法を提供する。

【0011】要約すると、本発明の測定法は、着色板を用いて作製した角質細胞標本（以下、「表面標本」という）を表側（体表面側）から観察する方法、さらに粘着面着テープに角質細胞を採取したもの（以下、「裏面標本」という）を裏側から観察する方法、さらにこれらに加えて透明板上で角質細胞を染色して得られる標本（以下、「染色標本」という）を観察する方法である。

【0012】尚、本明細書において、皮膚のダメージ度とは、皮膚のバリア機能の低下の度合いをいい、具体的には、有核細胞の出現、多層細胞群の存在、P A S陽性細胞の出現、角層細胞膜表面のS H基の蛍光強度、角層表面のスポンジ状構造や角層裏面の微細絨毛様突起の出現等により総合評価されるものである。

【0013】以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】＜1＞本発明の皮膚角質細胞のダメージ度の測定法に用いる角質細胞標本

（1）表面標本

表面標本は、細胞表面に穴や皺を認めるスポンジ状構造、溝状の構造及び細胞表面の凹凸等を観察するための標本である。

【0015】本発明に用いる粘着性物質を塗布したテープは、このテープの粘着面を皮膚に押し付け、テープを皮膚から剥して角層を採取するために使用するものである。この粘着性物質は、有機溶剤に可溶である樹脂又は

高分子化合物が用いられ、例えば、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリビニルエーテル、ポリブテン、アスファルト、及び、天然ゴム又はその誘導体、S B R系ゴム、N B R系ゴム、ブタジエンービニルピリジン系ゴム、ブチルゴム、クロロプレン系ゴム、再生ゴム、シアノアクリレート系ゴム、アラビアゴム、トラガントゴム等のゴム質などが挙げられる。これらは、1種又は2種以上よりなる混合物を単独あるいは他の基材に含有させたものが用いられる。

【0016】上記の粘着物質のうちでも、天然ゴム又はその誘導体、S B R系ゴム、N B R系ゴム、ブタジエンービニルピリジン系ゴム、ブチルゴム、クロロプレン系ゴム、再生ゴム、シアノアクリレート系ゴム、アラビアゴム、トラガントゴム等のゴム質はテープを剥がす際の剥離性及び角質細胞を変化させないという点で好ましい。テープは、一般的又は工業的に使用されているものでよく、材質としては、例えば、セロファン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ふっ素樹脂等のプラスチック素材等が挙げられる。また、形状としては、均一な厚みを有するものの他、細孔を有するもの、網目状であるもの等も使用可能である。

【0017】本発明には、このようなテープに前記粘着物質を塗布したものを使用するが、粘着テープとして市販されているもの、例えばセロハンテープ等もそのまま使用することができる。

【0018】前記粘着性物質を溶解させるために用いる有機溶剤としては、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、エーテル、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、T H F、酢酸エチル、oーキシレン、mーキシレン、pーキシレン、メチルベンゼン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、ベンゼン、トルエン、酢酸アミル等が挙げられ、これらの1種又は2種以上を混合又は併用して使用される。

【0019】次に、本発明に用いる固着剤は、後述する着色板あるいは透明板に皮膚角層を固定するために使用されるものであり、角質細胞を変形させないものであって、かつ、上記の有機溶剤に易溶でないものが使用される。このような固着剤としては、公知の接着剤、タンパク質等が挙げられるが、得られる角質細胞標本がより鮮明であるという理由から、公知の接着剤等が好適に使用され、具体例としては、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリビニルアルコール等のポリビニル系接着剤、メラミン樹脂接着剤、フェノール樹脂接着剤、レゾルシノール系接着剤、キシレン樹脂接着剤、フuran樹脂接着剤、ポリイソシアネート樹脂接着剤、ポリエステル樹脂接着剤、ポリアミド系接着剤、ポリブテン接着剤、エチレン共重合系接着剤、熱可塑性ポリエステ

ル接着剤、ポリエステルアクリレート接着剤、シリコンゴム系接着剤、フェノール混合系接着剤、エポキシ系接着剤、シアノアクリレート系接着剤、嫌気性ポリエステル接着剤、ポリベンツイミダゾール系接着剤、ポリイミド系接着剤、メタロキサン系接着剤、にかわ系接着剤、カゼイン系接着剤、セルロース系接着剤等が挙げられ、これらの1種又は2種以上を混合して用いるものである。

【0020】これらの接着剤のうちでも、染色した場合に染まりにくいという点で、ポリ塩化ビニル系接着剤が最も好ましい。又、上記のタンパク質としては、例えば、卵白アルブミン、乳アルブミン、ミオゲン、血清アルブミン、グロビン、ロイコシン等のアルブミン類、血清グロブリン、 β -ラクトグロブリン、リゾチーム、ミオシン、エデスチン、インシュリン、フィブリノーゲン、チログロブリン等のグロブリン類、可溶性コラーゲン、エラスチン、ケラチン、絹フィブロイン、スポンジン、ゴルゴニン、ヒストン、プロタミン、卵白、ゼラチン、ペプトン、ペプチド、その他、リントタンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質等が挙げられ、これらの1種又は2種以上よりなる混合物を単独あるいは多価アルコール等の他の基材に含有せしめたものが用いられる。

【0021】また、本発明に用いる着色板は、皮膚細胞表面の形態異常等を観察するための標本を得るために必要なものであり、黒、緑、青等に着色され、鋸で容易に切断でき、且つ、有機溶剤に不溶又は難溶なものである。樹脂板に着色が必要なる理由は、転写した角質細胞を明確に確認した上で標本作製をするためである。透明板では、白色の角質細胞を明確に判別することが困難であり、また、走査型顕微鏡標本として試料台に固定できない。誤って角質細胞を貼付していない面を表にして走査型電子顕微鏡標本作製してしまう可能性があるため着色してあることが好ましい。具体的には、プラスチック板又はポリメチルペンテン、ポリエチレン等の樹脂板などが挙げられ、この中でも固定した角質細胞が肉眼で判別でき、切断性及び耐溶剤性の点から黒色のプラスチック板が最も好ましく用いられる。

【0022】次に、上記材料を用いて表面標本作製する方法を説明する。まず、テープの粘着性物質を塗布してある面を皮膚に押し当て、テープ部分の粘着性物質を塗布していない面を指で押し付け軽く2～3回擦り、テープを皮膚に密着せしめ、ついで、一定の力で一定の方向からテープを剥がす。次に、このテープをあらかじめ前記固着剤を塗布せしめた着色板に張り付ける。この際、着色板にあらかじめ固着剤を塗布しないと、以下に述べるテープを剥がす段階において、角層が着色板より遊離してしまう。又、角層を保持したテープを着色板に張り付ける際には、テープ幅3～10mm程度に切断しておくことが好ましい。

【0023】テープ幅が広すぎる場合は、有機溶剤の浸

透性が悪く、又、取扱上不便である。尚、窓孔を有するホルダーに、この窓孔に対応するようにテープを貼着したものを用意しておくと、ホルダーごとテープを皮膚に密着させることができ、さらにホルダーの枠をてことして利用することにより一定の力で一定の方向からテープを剥がすことができ、常に一定量の角層の一部をテープ上に採取することができる。

【0024】次に、上記のテープを張り付けた着色板を前記の有機溶剤に2～4時間浸漬し、テープに付着している粘着性物質を溶解せしめ、該テープを透明板及び着色した樹脂板より自然に剥離せしめる。剥離後の粘着性物質の残りを除去する目的で、新たな有機溶剤に浸漬することも好適である。しかる後有機溶剤を乾燥させると、角質細胞が着色板に固定された表面標本が得られる。

【0025】標本を走査型電子顕微鏡を用いて観察する場合には、標本の角質細胞を固定した着色板を1cm×1cm程度の大きさに切断し、それをあらかじめ1cm×1cm以下の大きさの両面テープを貼付した走査型電子顕微鏡試料台に固定し、金蒸着することが好ましい。

【0026】(2)裏面標本

裏面標本は、不規則で微細な皺と絨毛を認める微細絨毛様突起、円形状のくぼみ構造及び細いシワ状隆起等を観察するための標本である。これは、上記<1>と同様にして、粘着性物質を塗布したテープを皮膚に押し当て、テープの粘着性物質を塗布していない面を指で押し付け軽く2～3回擦り、テープを皮膚に密着せしめ、ついで、一定の力で一定の方向からテープを剥がすことにより得られる。裏面標本を走査型電子顕微鏡観察する場合には、標本のテープを1cm×1cm程度の大きさに切断して走査型電子顕微鏡試料台に両面テープ等で固定し、金蒸着することが好ましい。

【0027】(3)染色標本

染色標本は、角質細胞の不全角化と細胞剥離の異常、細胞浸潤の跡による炎症があった可能性、角質細胞の細胞膜上のSH基からSS結合への変換を評価するための標本である。

【0028】染色標本は、着色板の代わりに透明板を用いる以外は前記表面標本と同様にして透明板に角質細胞を固定し、さらに角質細胞を染色することにより得られる。ここで用いる透明板は、透明で角質細胞標本の観察を妨げず、且つ、有機溶剤に不溶又は難溶なものである。具体例としては、ガラス板又はポリメチルペンテン、ポリエチレン等の樹脂類が挙げられ、この中でも透明性及び耐溶剤性の点からガラス板が最も好ましく用いられる。

【0029】透明板に固定された角質細胞の染色としては、細胞質と核を染め分けるヘマトキシリン-エオシン染色(HE)、細胞浸潤の跡を示す多糖類を染めるPAS染色、角化過程における角層の成熟化に関係している

細胞表面のSH基からSS結合への変換の程度を評価するためのDACM（N-（7-ジメチルアミノ-4-メチル-3-クマリニル）-マレイミド）染色等が最適である。これらは、単独でも評価は可能であるが、2種又は3種の染色を行い総合評価を行うことが好ましい。

【0030】HE染色は、健常者では認められないが、アトピー性皮膚炎患者ではしばしば認められる核を持った細胞（有核細胞）を判別できると共に健常者では、細胞同士がバラバラに観察できるが、アトピー性皮膚炎患者では細胞同士が重なりあっている（多層細胞群）ことが観察できる。これらの観察結果から、不全角化と細胞剥離の異常についての情報を与えるものである。

【0031】PAS染色は、炎症に関係のある好中球や肥満細胞等を染めることができ、健常者では、ほとんど染まらないが、アトピー性皮膚炎患者では、細胞が青紫色にPAS陽性細胞として染まる。これらの観察結果は、細胞浸潤の跡を示し、炎症があった可能性を示唆するものである。

【0032】また、細胞が角化するにしたいが、細胞膜上のSH基がSS結合に変換していることが判っているが、DACM染色は、このSH基とSS結合を蛍光染色により染め分け、SH基からSS結合への変換が正常に行われているかどうかを判定できる。これにより正常な角化が行われているかどうかを評価できる。健常者では、SH基の蛍光が弱く、SS結合の蛍光が認められ、アトピー性皮膚炎患者では、SH基の蛍光がかなり強く、SS結合の蛍光が健常者と同様に認められている。

【0033】具体的には、角質細胞を透明板に移した後、HE、PASあるいはDACM等の染色液を用いて細胞質や核を染色し、バルサム封入を行い、これを染色

【0034】尚、HE、PAS染色のような可視光で判別できる染色による標本の観察は、通常の光学顕微鏡を用いて行い、DACM染色のように蛍光染色した標本は、蛍光顕微鏡を用いて観察する。

【0035】＜2＞本発明の皮膚角質細胞のダメージ度の測定法

上記表面標本を、光学顕微鏡あるいは好ましくは走査型電子顕微鏡を用いて観察し、スポンジ状構造、溝状の構造、細胞表面の凹凸等の有無を判定することにより、細胞の形態学的な変化を判定できる。健常者の細胞表面は、平滑でスポンジ状構造、溝状の構造、細胞表面の凹凸等がほとんど認められないが、アトピー性皮膚炎患者では、スポンジ状構造、溝状の構造、細胞表面の凹凸等が強く認めらる。

【0036】また、裏面標本を同様に光学顕微鏡あるいは走査型電子顕微鏡を用いて観察し、微細絨毛突起、円形状のくぼみ、シワ状隆起の有無を判定することにより、細胞の形態学的な変化を判定できる。健常者の細胞表面の裏面は、平滑で微細絨毛様突起、円形状のくぼ

み、シワ状隆起等がほとんど認められないが、アトピー性皮膚炎患者では、微細絨毛様突起、円形状のくぼみ、シワ状隆起等が強く認められる。

【0037】表面標本のみの観察所見からも、アトピー性皮膚炎患者特有の細胞の形態学的な変化を判定することができるが、細胞を表面と裏面との両面から形態学的な検査をすることにより、細胞の表面の構造と裏面の構造の関連性が判明する。例えば、表面の穴や皺と裏面の微細絨毛様突起とが互いに細胞同士が上下に重なり合っていたことが説明できる。また、その重なりが、整然としたものか、乱れていたかが判定できる。したがって、両面からの観察所見から、細胞の配列や重層具合を詳しく調べることにより、一層正確に角質細胞のダメージ度を判定することができる。

【0038】さらに、上記観察所見に加えて、染色標本の顕微鏡観察所見を加えることにより、より一層正確な角質細胞のダメージ度の判定が可能となる。具体的には、得られた染色標本を光学顕微鏡により観察し、角質細胞に認められる有核細胞の有無、角質細胞の重層剥離を指標とする多層細胞群の有無、細胞浸潤の場合に認められる多糖類を指標とするPAS陽性細胞の有無等から角化異常の指標となる不全角化及び細胞剥離の異常、炎症状態の指標となる細胞浸潤の有無等を調べる。さらに、角質細胞に認められるSH基の蛍光強度及び核の位置の蛍光の有無とSS結合の蛍光強度及び不均一な斑状の蛍光の有無等から角化過程における角質細胞の形成異常を調べる。

【0039】

【実施例】以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。尚、本実施例ではホルダーを使用した

【0040】

【実施例1】7.6cm×2.6cmの長方形形状であり、端部に3.5cm×2.0cmの長方形の窓孔2を有するホルダー1（図1）に、窓孔2に対応するように4.0cm×2.6cmのセロハンテープ3（市販の粘着性セロハンテープを切断したもの）を貼着したものを用意した。ホルダー1の窓孔2の枠には、1mm毎に目盛り4が付してある。

【0041】このホルダー1ごと粘着テープ2の粘着面を、アトピー性皮膚炎患者の皮疹部に付け、指で押し付け軽く2～3回擦り、セロハンテープの粘着面を皮膚に密着せしめた。ついで、角層採取ホルダーの枠をてことして利用し、一定の力で一定の方向から皮膚からテープ2を剥がし、枠に付してあり目盛り4を目安として幅4mm、長さ5mmにカッター及びはさみを用いて切断し、これをあらかじめ塩化ビニル系樹脂接着剤を均一に塗布したスライドガラスに、テープの粘着面が接するように張り付けた。

【0042】次に、このスライドガラスをキシレンに3時間浸漬し、粘着テープの粘着物質を溶解させて、スライドガラスよりセロファンテープが剥離したのを確認してから、新たなキシレンに30分浸漬し、もう一度同様に新たなキシレンに30分浸漬した。3時間の浸漬によりセロファンテープが剥離していない場合は、自然に剥離せしめるまで、キシレンに浸漬すればよい。

【0043】その後、これを取り出し熱をかけずにキシレンを乾燥させた後、細胞質と核を染めるためのヘマトキシリン・エオシン（HE）染色及び多糖類を染めるためのPAS染色の2種類を常法に従い行い、乾燥後、常法によりバルサム封入して角質細胞の染色標本を作成し、光学顕微鏡観察を行った。

【0044】さらに、DACM染色を既に報告された方法を用いて行った。すなわち、SH基の染色は、角質細胞を固定したテープを4℃のTAS（塩化ナトリウム・トリサセタイトバッファー）で洗浄後、0.01mMDACM/TAS溶液を標本表面に滴下し、室温で3分間反応させ、再び4℃のTASで洗浄することにより行い、落射蛍光顕微鏡を使用して観察した。一方、SS結合の染色は次のようにして行った。標本を4℃のTASで洗浄後、0.15M NEM（N-エチルマレイミド）/TAS溶液で37℃で45分間反応させ、遊離のSH基をブロックした後、4℃のTASで充分洗浄後、40mMDTT（ジチオスレオール）・0.5mMEDTA（エチレンジアミン四酢酸）/TAS溶液洗浄を37℃で15分間反応させ、標本中のSS結合をSH基に還元し、4℃のTASで充分洗浄後、前述のSH基染色を行い、落射蛍光顕微鏡を使用して観察した。

【0045】角質細胞の表面標本は、黒色の塩化ビニル樹脂系接着剤を展延した転写用樹脂板に、角層を採取したセロファンテープの一部（5×4mm）を貼付し、上記と同様にしてキシレンに浸漬してセロファンテープを剥離させ、キシレンを乾燥させることにより得た。この標本を、走査型電子顕微鏡用試料台（15mmφ）に両面テープで固定し、E-101型イオンスパッタ（日立製作所製）を用いて金蒸着した。

【0046】裏面標本は、角層を採取したセロファンテープの一部をそのまま標本とし、走査型電子顕微鏡用試料台（15mmφ）に両面テープで固定し、同様に金蒸着した。

【0047】これらの表面標本及び裏面標本を、走査型

電子顕微鏡観察を用いて倍率2,500倍程度で観察し、写真撮影を行った。各標本の観察項目は以下の如くである。

【0048】（光学顕微鏡所見）

HE染色（図2）：有核細胞の出現の程度及び多層細胞群の存在の程度

PAS染色（図3）：有核細胞の出現の程度及びPAS陽性細胞の出現の有無

DACM染色（図4）：健康人と比較したSH基、SS結合の蛍光強度、特異な所見としてSH基の核の位置の蛍光及びSS結合のまだら状蛍光

【0049】（走査型電子顕微鏡所見）

表面標本（図5）：スポンジ状構造

裏面標本（図6）：微細絨毛様突起

【0050】上記観察項目について、各々4グレード（陰性-、弱度±、強度+、かなり強度++）で評価し、各々のグレードを0、0.5、1.0、2.0として数値化し、各観察所見の評点の平均値を算出した。但し、有核細胞の出現については、HE染色とPAS染色の2サンプルの観察結果の平均を用いた。結果を表1に示す。尚、角層の採取は、健康小児と小児アトピー性皮膚炎患者について実施し、角質細胞の不全角化、細胞剥離の異常、細胞浸潤の有無、角化過程における角質細胞の形成異常を調べた。

【0051】得られた各角質細胞標本は、従来にない鮮明な標本であり、図2～6に見られる如く、角質細胞が明瞭に観察され、健康な小児と小児アトピー性皮膚炎患者の角質細胞の病理組織学的及び形態学的な相違を詳細に観察できるので、アトピー性皮膚炎による角質細胞の異常を調べることができた。

【0052】表1に見られる如く、小児アトピー性皮膚炎患者において、症状の軽快に伴って角層検査所見の値が減少し、本方法により皮膚のダメージ度を測定することにより、アトピー性皮膚炎の臨床症状の経過観察を評価できた。

【0053】また、皮膚のダメージ度の測定は、表1及び図5に示したように、表面標本の観察のみから行うことができるが、裏面標本、さらには染色標本の観察所見を加えることにより、一層確実な測定ができる。

【0054】

【表1】

角層検査所見	臨床症状の強さ				健常小児
	微弱	弱度	中程度	強度	
有核細胞	0.25	0.28	0.76	1.00	0.06
多層細胞群	0.38	0.38	0.33	0.78	0.47
PAS陽性細胞	0.63	0.42	0.67	0.86	0.12
DACMSE基の蛍光強度	0.00	0.04	0.40	0.50	0.00
SE基の核の位置の蛍光	0.00	0.04	0.20	0.45	0.00
DACMSS結合の蛍光強度	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SS結合のまだら状蛍光	0.00	0.35	0.20	0.33	0.00
表面側スポンジ状構造	0.25	0.35	0.37	1.27	0.00
裏面微細絨毛様突起	0.00	0.69	1.38	2.00	0.44
部 位 数	4	13	15	11	6

【0055】

【実施例2】実施例1と同様に各標本の作製を行ったが、角層の採取を、アトピー性皮膚炎患者1例の初診時と2日後の2回行い、その所見の違いから、治療に使用した薬剤の有効性を評価した。2回の各角層検査所見を合計し、その総合評点を比較し、差が2を越える場合を*

*著名改善、1を越えて2以下の場合をやや改善、0.5を越えて1以下の場合をやや改善、0.5以下からー0.5以上までの場合を不変、ー0.5未満の場合を悪化と判定した。その結果を表2、3に示した。

【0056】

【表2】

	有核細胞	多層細胞群	PAS陽性細胞	SEの蛍光	SE核の蛍光	SSの蛍光	SSの斑蛍光
初診時	3.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00
2日後	0.30	0.50	1.00	0.50	1.00	0.00	0.00

【0057】

【表3】

	スポンジ状構造	溝状構造	細胞表面の凹凸	微細絨毛様突起	円形状くぼみ	シワ状の突起	総合評点	評価
初診時	1.00	0.00	0.50	1.00	0.00	0.00	10.5	著明
2日後	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	3.8	改善

【0058】この結果から、アトピー性皮膚炎患者の皮膚部がかなり改善していることが判明し、治療が有効であったことが示された。

【0059】

【発明の効果】本発明により、非侵襲的に皮膚のダメージ度を簡単に測定することができる。角質細胞の表面標本の作製に着色板を使用したことで、白色の角質細胞を明確に判別することができ、電子顕微鏡試料台に固定する際に裏表を誤認することを防止することができる。また、本発明に用いる標本は安定に保存でき、更に、1サンプルより数種の染色が行え、鮮明な観察ができるので、皮膚疾患の経過状況を把握でき、皮膚診断に有効に

利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ホルダーの一例を示す斜視図。

【図2】本発明の方法に用いたHE染色標本（実施例1）の光学顕微鏡写真（倍率約350倍）である（生物の形態）。左は健康な小児の標本、右はアトピー性皮膚炎患者の標本である。

【図3】本発明の方法に用いたPAS染色標本（実施例1）の光学顕微鏡写真（倍率約350倍）である（生物の形態）。左は健康な小児の標本、右はアトピー性皮膚炎患者の標本である。

【図4】本発明の方法に用いたDACM染色標本（実

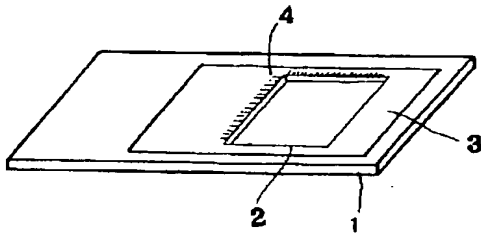
13

施例 1) の光学顕微鏡写真 (倍率約 350 倍) である (生物の形態)。左は健康な小児の標本、右はアトピー性皮膚炎患者の標本である。

【図 5】 本発明の方法に用いた角質表面標本 (実施例 1) の走査型電子顕微鏡写真 (倍率約 1250 倍) である (生物の形態)。左は健康な小児の標本、右はアトピー性皮膚炎患者の標本である。

【図 6】 本発明の方法に用いた角質裏面標本 (実施例

【図 1】



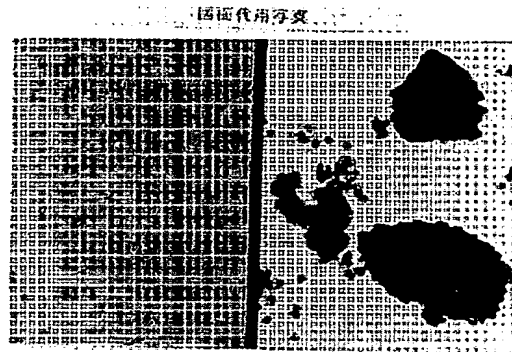
14

1) の走査型電子顕微鏡写真 (倍率 1250 倍) である (生物の形態)。左は健康な小児の標本、右はアトピー性皮膚炎患者の標本である。

【符号の説明】

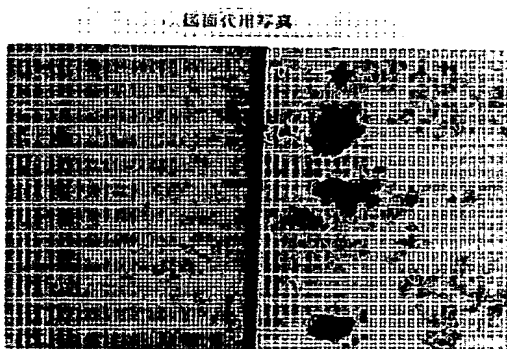
1. ホルダー
2. 窓孔
3. 粘着物質を塗布したテープ
4. 目盛り

【図 2】



写真

【図 3】



写真

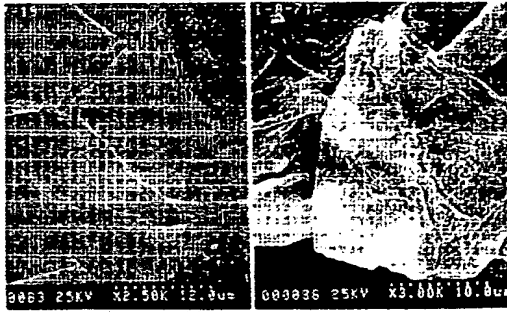
【図 4】



写真

【図5】

図面代用写真



写 真

【図6】

図面代用写真



写 真